

10/535395

JC06 Rec'd PCT/PTO 18 MAY 2005

DOCKET NO.: 272478US0XPCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Michel SEVE, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/03413

INTERNATIONAL FILING DATE: November 18, 2003

FOR: PROTEIN SPECIFIC TO PANCREATIC BETA CELLS IN ISLETS OF LANGERHANS  
AND APPLICATIONS THEREOF

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
France	02 14374	18 November 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/03413. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number

**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)



REC'D 04 FEB 2004	
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 NOV. 2003

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 0 1 / 210502

<b>REMARQUES</b> DATE: 16 NOV 2002 LIEU: 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT: 0214374 NATIONALITÉ ATTRIBUÉE PAR L'INPI: DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI: 16 NOV. 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif): BLO/CGAmIF263/85FR		<b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> Cabinet ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>NATURE DE LA DEMANDE</b> Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N° _____ Date _____ N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> POLYNUCLEOTIDE SPECIFIQUE DE LA CELLULE PANCREATIQUE BETA DES ILOTS DE LANGERHANS			
<b>DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement public 31-33 rue de la Fédération 75015 PARIS FRANCE Française N° de télécopie (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR

REMISE DES FICHES DATE 15 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0214374 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 2H
<b>15 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		ORES Béatrice Cabinet ORES 6 avenue de Messine 75 008 PARIS FRANCE 01.45.62.75.00 01.45.62.69.99 ores@cabinet-ores.com	
<b>16 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>17 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>18 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition, <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>19 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>20 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES (n°92-4046)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> MME BLANCANEUX	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



REMPLEZ CES CHAMPS  
DATE  
LIEU  
18 NOV 2002  
75 INPI PARIS  
0214374  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Réservé à l'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 S v / 010702

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		BLO/CGAmIF263/85FR	
<b>1 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation	
		Date	N°
		Pays ou organisation	
		Date	N°
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b>	
		<input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
		Nom ou dénomination sociale	
		Prénoms	
Forme juridique		Etablissement Public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Domaine Universitaire de Saint -Martin d'Hères	
	Code postal et ville	13 8 0 4 1 GRENoble CEDEX 9	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> <b>Personne morale</b>	
		<input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	
Béatrice ORES (n°92-4046)		MME BLANCANEUX	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

## **Polynucléotide spécifique de la cellule pancréatique bêta des îlots de Langerhans**

La présente Invention est relative à un nouveau polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, exprimé de manière spécifique par la cellule  
5 pancréatique bêta des îlots de Langerhans, à la protéine codée par ledit polynucléotide, impliquée dans la maturation et l'exocytose de l'insuline, ainsi qu'aux utilisations desdits polynucléotide et protéine.

Le diabète est une des maladies les plus fréquentes, atteignant  
5% de la population des pays industrialisés et en constante augmentation dans  
10 tous les pays du monde (prévision : 300 millions en 2025, dont 2,4 millions en France). Parmi les diverses formes de diabète, le diabète de type I ou insulino-dépendant affecte environ 500 000 à 1 million d'américains et 150 000 patients en France soit 0,2 à 0,4 % de la population. Les symptômes  
15 caractéristiques comprennent un niveau élevé de sucre dans le sang et dans les urines, une diurèse importante, une faim et une soif intenses ainsi qu'une perte de poids.

Le diabète de type II non insulino-dépendant (DNID), aussi décrit sous le nom de diabète "gras" ou diabète de la maturité, survient souvent  
20 autour de la cinquantaine. Il est traité par un régime, des médicaments pris par voie orale, et l'insuline, après quelques années d'évolution. Aujourd'hui, 2 millions de Français sont traités par des médicaments antidiabétiques et/ou de l'insuline.

Bien que le diabète puisse être contrôlé par des injections d'insuline et des apports contrôlés en glucides, les complications associées à  
25 cette pathologie nécessitent de nos jours de nouvelles approches, dans sa prévention, son traitement et son diagnostic.

Le pancréas comprend deux structures distinctes aussi bien morphologiquement que physiologiquement :

- le pancréas exocrine qui produit les enzymes intervenant  
30 dans la digestion (amylase, lipase, etc.) et le bicarbonate de sodium ;
- le pancréas endocrine qui produit les hormones intervenant dans le contrôle du glucose sanguin (insuline, glucagon, somatostatine et polypeptide pancréatique).

Les cellules du pancréas endocrine sont organisées en micro-

organes dispersés dans le pancréas sous forme d'îlots (îlots de Langerhans ou îlots pancréatiques). Chaque îlot pancréatique est composé de 4 types cellulaires : les cellules alpha, bêta, delta, et les cellules PP. Les cellules alpha sont situées à la périphérie de l'îlot et secrètent le glucagon. Les cellules bêta sont retrouvées au centre de l'îlot et sont les seules cellules capables de sécréter l'insuline en réponse au glucose. Les cellules delta sont à la périphérie et secrètent la somatostatine. La fonction des cellules PP est plus controversée (synthèse du polypeptide pancréatique).

L'absence de modèle cellulaire d'étude de la cellule bêta, ainsi que l'absence de moyen fiable et efficace de tri cellulaire adapté à ce type de cellule, freine l'étude de son fonctionnement et donc la mise au point de nouvelles méthodes de traitement du diabète de type I et II.

Parmi les traitements du diabète, outre l'administration régulière d'insuline, une des voies du contrôle physiologique de la glycémie et de la normalisation de la glycémie chez les diabétiques est le passage par la restauration d'une sécrétion d'insuline *in vivo* à partir de cellules. Dans cette optique plusieurs solutions ont été proposées :

- l'obtention de cellules productrices d'insuline chez l'animal pour la réalisation d'une xénotransplantation ;
- la différenciation *in vitro* en cellules sécrétrices d'insuline à partir de cellules souches isolées, dans un but de réimplantation [1], ceci afin de contourner les problèmes d'immunité et la nécessité d'un traitement immunosuppresseur du patient. Mais la production de quantités importantes de cellules à faible coût, productrices d'insuline par différenciation de cellules souches, nécessite de nouveaux outils biomoléculaires, notamment utiles pour le phénotypage et la purification des cellules différenciées ;
- la transplantation d'îlots pancréatiques ; de nombreux travaux ont eu récemment pour objet la préparation d'îlots ou de cellules bêta pancréatiques à des fins thérapeutiques. La première étape de la transplantation est le prélèvement du pancréas sur un donneur en état de mort cérébrale. L'isolement des îlots commence par une digestion enzymatique du pancréas au moyen d'une solution de collagénase. Toutes les transplantations ne requièrent pas une purification des îlots digérés. Toutefois, la plupart des chercheurs s'accordent aujourd'hui pour dire que la purification des îlots est nécessaire pour une allotransplantation [2]. Les îlots sont ensuite transplantés,

à raison d'une masse suffisante (minimum 3000 IEQ/kg) par injection intraportale (IEQ : Islet Equivalent, Equivalent Ilôt).

5 Toutefois, l'isolement d'îlots ou de cellules bêta pancréatiques nécessite des moyens de sélection et d'identification des cellules bêta, spécifiques et fiables.

Des travaux antérieurs ont tenté de mettre au point des méthodes de marquage des cellules bêta. On peut citer :

- 10 - le marquage par la GFP (Green Fluorescent Protein) qui permet un marquage fluorescent de la cellule. L'inconvénient majeur de cette technique est la nécessité d'introduire un gène exogène ou transgène dans la cellule, qui plus est par l'utilisation d'un vecteur viral (adénovirus) [1] ;
- la technique basée sur l'autofluorescence importante de la cellule bêta [2]. Mais cette technique manque de spécificité vis-à-vis du type cellulaire ;
- 15 - l'incubation des cellules avec un fluorochrome spécifique du zinc : le Newport Green [3] ou la dithizone [4]. Cette technique est basée sur la teneur importante en zinc de la cellule bêta. Le zinc est un constituant important des granules de sécrétion de l'insuline, et en outre, joue un rôle dans le contrôle de cette sécrétion [5]. Mais ces techniques présentent de nombreux
- 20 inconvénients : utilisation d'un produit chimique, risque de toxicité vis-à-vis de la cellule bêta, manque de spécificité vis-à-vis du type cellulaire. De plus, la dithizone pose un problème de photodégradation rapide [6] ;
- la mise en évidence de manière indirecte par reconnaissance par un clone de cellules T (WO 91/17186) d'un antigène
- 25 exprimé par les cellules bêta. Les travaux initiaux sur cet antigène n'apportaient pas de résultats en terme de caractérisation de la séquence peptidique, ainsi qu'en terme de sélectivité de la cellule bêta par rapport aux autres types cellulaires de l'îlot, mais également du pancréas ou de l'organisme. Des travaux plus récents des mêmes auteurs montrent une
- 30 distribution beaucoup plus large de cet antigène, qui de fait n'est pas spécifique de la cellule bêta [7].

En conséquence, il existe un manque de marqueur spécifique et fiable de la cellule bêta des îlots pancréatiques de Langerhans.

C'est un des buts de la présente Invention que de fournir un tel



marqueur.

L'îlot de Langerhans accumule de très grandes quantités de zinc et nécessite donc un transporteur très efficace et très spécialisé pour accumuler ce zinc dans les vésicules de sécrétion [8]. L'insuline, produite et stockée dans la cellule pancréatique bêta, est libérée dans le milieu extracellulaire par exocytose en réponse à des stimuli externes, comme une élévation de la concentration en glucose. Cette élévation du glucose provoque une modification du rapport ATP/ADP, la fermeture des canaux potassiques et l'ouverture des canaux calciques qui provoque l'exocytose [9].

Il est connu qu'en présence de zinc, l'insuline peut former des tétramères et des hexamères qui fixent le zinc dans un rapport insuline : zinc de 4 :1 et 6 :2 respectivement. L'insuline est stockée dans les granules de sécrétion sous la forme d'un solide composé d'hexamères liés à 2 atomes de zinc par hexamère. Les vésicules contiennent du zinc en un excès de 1 à 1,5 fois la quantité nécessaire pour former les hexamères insuline-zinc. Au cours de l'exocytose de l'insuline, les vésicules riches en insuline fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule bêta et libèrent l'insuline mais également le zinc, dans la circulation. Le zinc libéré agit dans une boucle de rétrocontrôle négatif sur les canaux potassiques, provoquant son activation et l'arrêt de l'exocytose.

Dans les cellules de mammifères, 7 protéines homologues d'export du zinc, nommées ZnT-1, -2, -3, -4, -5, -6 et -7 ont été clonées et caractérisées. L'analyse de la structure primaire de ces protéines a permis de définir un motif structural commun composé de 6 domaines transmembranaires et d'une boucle intracellulaire riche en histidine. ZnT-1 est un transporteur ubiquitaire localisé dans la membrane plasmique qui assure l'efflux de zinc hors de la cellule [11]. ZnT-2 permet à la cellule de tolérer un excès de zinc dans le milieu de culture, conférant ainsi une résistance au zinc par une localisation de celui-ci dans des vésicules intracytoplasmiques acides, assurant ainsi une accumulation du zinc dans la cellule bien supérieure à la normale [12]. ZnT-3 et ZnT-4 clonés chez l'homme, ont des fonctions similaires à ZnT-2. ZnT-3 est spécifique de certains tissus et fortement exprimée dans le cerveau, dans les membranes des vésicules synaptiques riches en zinc, dans les fibres moussues de l'hippocampe et dans les testicules. ZnT-4 est exprimée de manière ubiquitaire, mais des niveaux plus élevés sont retrouvés dans le cerveau et les cellules épithéliales. Ce transporteur est essentiel dans

l'épithélium mammaire où il participe au contrôle du contenu en zinc du lait maternel. ZnT-5 et ZnT-6 sont aussi des transporteurs ubiquitaires localisés dans l'appareil de Golgi. ZnT-7 est un transporteur ubiquitaire, localisé spécifiquement dans le réticulum endoplasmique des cellules.

5 Des travaux précédents mentionnent une tentative de recherche de gènes impliqués dans le métabolisme du zinc dans la cellule bêta pancréatique. Ces travaux n'ont pas débouché sur la découverte d'une protéine ou d'un transporteur spécifique [10].

10 Les Inventeurs ont isolé un polynucléotide de 1110 nucléotides (SEQ ID N°1) correspondant à l'ADNc d'un ARNm exprimé de manière spécifique dans l'îlot de Langerhans, et plus particulièrement dans la cellule sécrétrice d'insuline ou cellule bêta.

15 Le polynucléotide de l'invention, code pour une protéine, nommée ZnT-8, (SEQ ID N°2), de 369 acides aminés, de masse moléculaire estimée à 40,8 KDa et de structure primaire homologue aux protéines de la famille ZnT. L'étude du potentiel transmembranaire de la protéine ZnT-8 complète montre qu'elle possède 6 domaines transmembranaires prédits (acides aminés 74-95, 107-126, 141-163, 177-196, 216-240, 246-267), les extrémités N- et C-terminales étant situées dans le cytoplasme. Cette étude  
20 montre également que la structure secondaire de cette protéine présente 3 boucles d'acides aminés extracellulaires (acides aminés 96-106, 164-176, 241-245).

25 Le polynucléotide de l'invention ou la protéine pour laquelle il code, constituent pour la première fois un marqueur spécifique et fiable de la cellule bêta des îlots pancréatiques de Langerhans. Un tel outil permet d'envisager un tri et un repérage sélectif des cellules bêta, sans modification chimique ou biologique desdites cellules. Par ailleurs, ledit polynucléotide de l'invention ou la protéine pour laquelle il code peuvent être avantageusement utilisés dans le traitement du diabète et dans son suivi. Un tel polynucléotide  
30 peut également avantageusement être mis en œuvre dans le diagnostic précoce du diabète dans les familles à risque, notamment en ce qu'il permet de détecter des mutations observables dans le gène ZnT-8 et aussi de diminuer voir de supprimer les examens habituellement mis en œuvre.

35 Ainsi, la présente invention a pour objet un polynucléotide isolé, comprenant ou répondant à une séquence sélectionnée dans le groupe

constitué par les séquences suivantes :

- a) La séquence SEQ ID N°1 ;
- b) Un fragment de la séquence SED ID N°1 d'au moins 15 nucléotides consécutifs, à l'exception des EST présentant les numéros d'accès dans la base de données GenBank BM565129, BM310003, BM875526, BG655918, BQ417284, BQ267316, BU072134, BQ267526, BQ270198, BU581447, BU070173 et BQ631692 ;
- c) Un acide nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% après alignement optimal avec l'une des séquences définies en a) ou en b) ;
- d) Un acide nucléique s'hybridant de manière spécifique avec l'une des séquences définies en a) ou en b) ;
- e) Un acide nucléique complémentaire, sens ou antisens de l'une des séquences définies en a), b), c) ou d).

Le polynucléotide selon l'invention peut être isolé à partir de cellules de Langerhans ou à partir de banques d'ADN cellulaire, particulièrement de banques d'ADN de cellules pancréatiques, très particulièrement à partir d'une banque d'ADN de cellules pancréatiques humaines. De préférence, les cellules utilisées sont des cellules des îlots de Langerhans.

Le polynucléotide de l'invention peut également être obtenu par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) effectuée sur l'ADN total des cellules de Langerhans, par RT-PCR effectuée sur les ARN totaux des cellules bêta d'îlots pancréatiques de Langerhans ou par synthèse chimique.

Au sens de la présente invention les définitions suivantes s'appliquent.

Par polynucléotide, on entend un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, comportant ou non des nucléotides non naturels. Ainsi, ce terme recouvre toute séquence qui code pour une protéine ZnT-8 ou un fragment de ladite protéine (ADN génomique, ARN, ADNc) mais aussi les oligonucléotides, sens ou antisens, ainsi que les petits ARN interférents (small interfering RNA, siRNA) correspondants.

Par "acides nucléiques ou protéines présentant un

pourcentage d'identité après alignement optimal avec une séquence de référence", on entend désigner les acides nucléiques ou les protéines présentant, par rapport à la séquence de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence en nucléotides présente au moins 80 % d'identité et la séquence en acides aminés présente au moins 65% d'identité après alignement optimal avec la séquence en nucléotides ou en acides aminés de référence.

Par "pourcentage d'identité" entre deux séquences (acides nucléiques ou protéines), on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur.

Par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", on entend désigner l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme décrit ci-après est le plus élevé. Les comparaisons entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées : en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par "fenêtre de comparaison" pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, notamment à l'aide de l'un des algorithmes suivants : l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970), la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), les logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, BLASTX, TBLASTX, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou sur les serveurs internet, en particulier ceux du *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de l'EMBL (<http://www.embl.org>) et du projet Ensembl (<http://www.ensembl.org>)).

Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250, ainsi qu'une matrice d'identité pour les séquences de nucléotides.

Pour obtenir une "hybridation spécifique" on utilise de préférence des conditions d'hybridation de forte stringence, c'est-à-dire des conditions de température et de force ionique choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation spécifique et sélective entre  
5 polynucléotides complémentaires.

A titre d'illustration, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les polynucléotides décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes : l'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en  
10 tampon phosphate (20 mM pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour  
15 une sonde de taille supérieure à 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille supérieure à 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus  
20 pour une sonde de taille définie peuvent être adaptées par l'Homme du Métier pour des sondes de taille plus grande ou plus petite.

Par "techniques ou méthodes appropriées" on entend ici se référer aux techniques ou méthodes bien connues et classiquement utilisées par l'Homme du Métier et exposées dans de nombreux ouvrages, comme en  
25 particulier celui intitulé Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press) [13].

L'acide nucléique selon l'invention définie en c) présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec une séquence telle que définie en a) ou b), de préférence 90 %, de façon plus  
30 préférée 95 %, de façon encore plus préférée 98 %. Sont inclus dans les acides nucléiques selon l'invention définie en c) les polynucléotides variants de la séquence SEQ ID N°1, c'est-à-dire l'ensemble des polynucléotides correspondants à des variants alléliques, c'est-à-dire à des variations individuelles de la séquence SEQ ID N°1. Ces séquences variantes naturelles  
35 correspondent à des polymorphismes présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment à des polymorphismes pouvant

conduire à la survenue d'une pathologie, comme par exemple la mort cellulaire des îlots de Langerhans et un diabète.

On entend également désigner par polynucléotide variant, tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou d'une variation d'un site d'épissage de la séquence génomique dont l'ARNm a comme ADN complémentaire le polynucléotide de séquence SEQ ID N°1.

De préférence, la présente Invention concerne les polynucléotides variants de la séquence SEQ ID N°1, particulièrement ceux dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine codée par la séquence SEQ ID N°1.

L'Invention a également pour objet des fragments d'au moins 15 nucléotides, de préférence 20 nucléotides, encore plus préférentiellement 25 à 30 nucléotides des polypeptides tels que définis ci-dessus, à l'exception des EST présentant les numéros d'accension BM565129, BM310003, BM875526, BG655918, BQ417284, BQ267316, BU072134, BQ267526, BQ270198, BU581447, BU070173 et BQ631692 ; De tels fragments peuvent notamment être utilisés comme sondes ou comme amorces pour détecter/amplifier des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide selon l'Invention dans d'autres organismes.

Préférentiellement les paires d'amorces utilisables selon l'Invention sont celles correspondants aux paires définies par les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 et par les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6.

L'Invention a aussi pour objet les polynucléotides susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide des amorces selon l'Invention.

Les sondes et amorces selon l'Invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'Homme du Métier, afin d'obtenir un signal délectable et/ou quantifiable.

Le marquage des amorces ou des sondes selon l'Invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{33}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$ , le  $^3\text{H}$  ou l' $^{125}\text{I}$ . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents,

chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'Invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en œuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (U.S. N° 4,683,202). D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin, la technique TAS (Transcription-based Amplification System), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction), la technique de RCR (Repair Chain Reaction), la technique CPR (Cycling Probe Reaction), la technique d'amplification à la Q-bêta-réplique. On peut encore citer la PCR-SSCP qui permet de détecter des mutations ponctuelles.

Ces techniques sont bien entendu parfaitement connues de l'Homme du Métier.

Comme sondes ou comme amorces, les différents polynucléotides de l'Invention permettent, soit de déterminer le profil de transcription du gène correspondant ou une éventuelle altération de ce profil dans un échantillon biologique, soit de mettre en évidence le gène correspondant, des variants alléliques de ce gène ou une éventuelle altération fonctionnelle de ce gène (changement substantiel dans l'activité de la protéine codée par ledit gène) résultant d'une mutation (insertion, délétion ou substitution) d'un ou plusieurs nucléotides au niveau d'au moins un exon dudit gène. De telles mutations incluent en particulier les délétions, les insertions ou les substitutions non-conservatives au niveau de codons correspondant à des résidus d'acides aminés situés dans un domaine essentiel pour l'activité biologique de la protéine.

Ainsi l'Invention a pour objet une méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide de l'Invention ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde marquée

constituée d'un polynucléotide selon l'invention dans des conditions appropriées d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

5 Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape de rétrotranscription et/ou d'amplification des transcrits réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telle que décrite précédemment et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

10 Ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène peut en outre comporter une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison avec un échantillon témoin préalablement choisi et éventuellement l'étude de sa corrélation avec un phénotype détectable comme par exemple le taux de proinsuline convertie en insuline mature, le contenu des  
15 cellules en insuline, le taux d'insuline sécrétée en réponse à une stimulation par le glucose, la concentration intracellulaire ou intravésiculaire en zinc ou encore la quantité de protéine (produit du gène) exprimée à la surface de la cellule). Ledit échantillon témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique présentant une transcription normale ou altérée du gène correspondant au polynucléotide de l'invention auquel ladite méthode de  
20 détermination du profil de transcription du gène est appliquée dans les mêmes conditions.

L'invention a aussi pour objet une méthode de mise en évidence du gène correspondant au polynucléotide de l'invention ou des variants alléliques dudit gène ou d'une altération fonctionnelle de ce gène,  
25 dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde marquée constituée d'un polynucléotide selon l'invention dans des conditions appropriées d'hybridation spécifique entre les ADN et la sonde et une troisième  
30 étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode la deuxième étape peut être une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telle que décrite précédemment et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés. La



méthode peut éventuellement comporter une quatrième étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

Cette dernière méthode peut également permettre d'isoler un allèle du gène correspondant au polynucléotide de l'invention, associé à un phénotype détectable, comme par exemple une variation de la glycémie post-prandiale, la présence ou non d'une sécrétion d'insuline, le taux de glucose circulant ou d'insuline sécrétée en réponse à une stimulation par du glucose, et d'une manière générale à une pathologie de type diabète de type I ou II ou encore à une anomalie du métabolisme du zinc. Le zinc excrété au cours de la libération de l'insuline agit sur les canaux potassiques, responsables par l'intermédiaire de canaux calciques de cette exocytose. Il y a donc une boucle de rétrocontrôle [14]. Le polypeptide de l'invention est impliqué dans l'accumulation du zinc dans les vésicules contenant l'insuline, et se retrouve également au cours de l'exocytose sur la membrane plasmique. Des mutants de la protéines pourraient donc modifier soit la quantité de zinc présent dans les vésicules, soit la concentration péricellulaire en zinc, et donc modifier l'état d'ouverture du canal potassique, aboutissant suivant l'effet de la mutation à une diminution ou une augmentation de l'excrétion d'insuline (diabète I ou hyperinsulinisme). Dans cette méthode particulière, l'échantillon biologique sera un échantillon provenant d'un individu exprimant ledit phénotype détectable.

Ces méthodes, particulièrement celles basées sur la recherche de mutations dans le gène, peuvent permettre la mise en évidence de façon préventive d'une prédisposition au diabète, ou le diagnostic du diabète ou de toute maladie liée au diabète, ou l'adaptation en terme de molécule ou de posologie du ou des traitements antidiabétiques.

L'invention a également pour objet une trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes précédemment décrites comprenant :

- a) au moins une sonde ou une paire d'amorces selon l'invention ;
- b) les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique à tester ;
- c) les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification ;

d) les réactifs nécessaires à la détection et/ou au dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

5 Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs afin d'assurer la qualité des résultats obtenus. Elles peuvent également contenir les réactifs nécessaires à la préparation des acides nucléiques à partir de l'échantillon biologique.

L'invention concerne également la protéine codée par le polynucléotide selon l'invention.

10 L'invention concerne aussi l'utilisation d'un polynucléotide tel que défini ci-dessus, pour la synthèse d'une protéine ZnT-8 telle que définie ci-dessus.

15 L'invention a également pour objet les polynucléotides susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide des amorces telle que définies ci-dessus.

Un autre objet de l'invention est une puce à ADN comprenant au moins un polynucléotide selon l'invention.

20 Encore un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un polynucléotide tel que défini ci-dessus pour la préparation d'une puce à ADN. L'Homme du Métier sait en fonction du support sélectionné, choisir la technique de réalisation appropriée pour réaliser une telle puce, comme par exemple par dépôt d'oligonucléotides sur support de verre ou de nylon, soit par greffage chimique ou électrochimique d'oligonucléotides.

25 L'invention a encore pour objet les oligonucléotides sens correspondants aux polynucléotides de l'invention qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression dudit polynucléotide de l'invention, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

30 L'invention a aussi pour objet les petits ARN interférents (small interfering RNA, siRNA) correspondants aux polynucléotides de l'invention, d'une taille inférieure à 30 nucléotides, de préférence d'une taille comprise entre 20 et 23 nucléotides, qui par interaction avec les ARNm correspondants au polynucléotide de l'invention, conduiront à leur dégradation. Ces siRNA peuvent être obtenus par toute méthode connue de l'Homme du Métier, par exemple par synthèse chimique ou encore par expression à partir d'un vecteur.

Le polynucléotide de l'Invention peut être utilisé *in vitro*, comme moyen d'étude :

5 a) de la surexpression du transporteur (ZnT-8) dans des lignées de cellules modèles (insulinome de rat INS-1 par exemple) et de l'impact sur la sécrétion de l'insuline en réponse à une stimulation par le glucose ;

b) de la sensibilité des cellules à la mort cellulaire (apoptose) induite par des conditions de stress oxydant ou de concentration faible ou forte en zinc ;

10 c) des étapes de différenciation de cellules souches en cellules sécrétrices d'insuline en réponse à différentes stimulations exogène (facteurs de croissance, extraits pancréatiques).

L'Invention a également pour objet une protéine isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend ou répond à une protéine choisie parmi :

15 a) la protéine de séquence SEQ ID N°2 ;

b) une protéine comportant au moins 60 % d'identité après alignement optimal avec ladite protéine ou au moins 65 % de similarité, de préférence 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, ou de manière encore plus préférée 90% d'identité ou au moins 95% de similarité avec la

20 protéine de séquence SEQ ID N°2 ;

c) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'une protéine défini en a) ou b).

25 Par "protéine" on entend, au sens de la présente Invention, désigner un enchaînement précis d'acides aminés, modifiés ou non, comportant ou non des acides aminés non naturels.

La protéine selon l'Invention est obtenue soit à partir d'une cellule bêta, soit par synthèse chimique, soit par recombinaison génétique.

30 La protéine selon la présente Invention lorsqu'elle est obtenue par synthèse chimique, peut être obtenue par l'une des nombreuses voies de synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en oeuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Dans ce cas la séquence de la protéine peut être modifiée afin d'améliorer sa

solubilité, en particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'Homme du Métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

5 La similarité d'une protéine par rapport à une protéine de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives, lorsque les deux séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente Invention, on entend par  
10 substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques similaires (taille, charge ou polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % de similarité avec une séquence de référence est définie, dans la  
15 présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations non-conservatives pour 100 acides aminés de la séquence de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altérations non-conservatives inclut les délétions, les substitutions non-conservatives ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de  
20 référence.

Sont incluses dans les protéines selon l'invention définie en b) les protéines variantes de la séquence SEQ ID N°2, c'est-à-dire les protéines variantes codées par les polynucléotides variants tels que précédemment définis, en particulier les protéines dont la séquence en acides aminés  
25 présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, une délétion, une substitution et/ou une addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport à la séquence SEQ ID N°2.

De manière préférée, les protéines variantes présentent une mutation liée à un diabète ou à un hyperinsulinisme.

30 De préférence, une protéine selon l'invention est une protéine répondant à la séquence SEQ ID N°2 (correspondant à la protéine codée par le gène *ZnT-8*) ou une séquence possédant au moins 80% d'identité avec SEQ ID N°2 après alignement optimal.

Le fragment de la protéine selon l'invention définie en c)  
35 répond de préférence aux séquences SEQ ID N°7 à SEQ ID N°10.

Un autre objet de l'Invention est une puce à protéine comprenant une protéine selon l'Invention.

Encore un autre objet de l'Invention est l'utilisation d'une protéine selon l'Invention pour la préparation d'une puce à protéine. Comme  
5 pour les puces à ADN, l'Homme du Métier sait en fonction du support choisi, choisir la technique de réalisation appropriée pour réaliser une telle puce.

La protéine ou la puce à protéine de l'Invention peuvent être utilisées pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre les protéines selon l'Invention dans le sérum d'un individu.

10 L'Invention concerne aussi l'utilisation de la protéine selon l'Invention pour des mesures par des méthodes immunochimiques et immunoenzymatiques, ainsi que la recherche d'auto-anticorps dirigés contre la protéine selon l'Invention.

15 L'Invention a également pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré le polynucléotide de l'Invention.

Un tel vecteur peut contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion de la protéine dans une cellule hôte.

20 Lesdits vecteurs comportent de préférence : un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement comprendre des séquences codant pour des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite tels que par exemple un promoteur fort de nature ubiquitaire,  
25 ou un promoteur sélectif d'un type de cellule et/ou de tissu particulier, comme par exemple le pancréas. Ces différentes séquences de contrôle sont choisies en fonction de l'hôte cellulaire utilisé.

30 Le polynucléotide selon l'Invention peut être inséré dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral. Les vecteurs viraux peuvent notamment être des adénovirus, des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques. L'Homme du

Métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus, ou les virus associés aux adénovirus (Adeno-associated virus ou AAV).

Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN ou l'ARN nu, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'Homme du Métier, et les vecteurs recombinants en résultant peuvent être introduits dans l'hôte approprié par des méthodes standards, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'Invention a aussi pour objet les cellules hôtes transformées, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, dans lesquelles au moins un polynucléotide selon l'Invention ou au moins un vecteur selon l'Invention a été introduit.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente Invention, on peut citer les cellules bactériennes, les cellules de levure, les cellules animales, en particulier les cellules de mammifères ou encore les cellules végétales. On peut citer également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en oeuvre des baculovirus.

L'Invention a également pour objet les organismes transgéniques tels que les animaux ou les végétaux transgéniques, dont tout ou partie des cellules contient le polynucléotide selon l'Invention ou le vecteur de l'Invention, sous une forme libre ou intégrée.

De préférence selon l'Invention, les organismes transgéniques sont ceux porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'Invention

non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

Selon l'Invention les animaux transgéniques sont de préférence des mammifères, excepté l'homme, plus préférentiellement les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins et les suidés, en particulier le porc.

5 Les animaux transgéniques peuvent être obtenus par toute méthode classique connue de l'Homme du Métier, comme par exemple par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

10 Les cellules, animaux ou végétaux transgéniques selon l'Invention peuvent ainsi exprimer ou surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'Invention ou leur gène homologue ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation.

15 Les animaux transgéniques peuvent être utilisés par exemple en temps que modèles pour l'étude de l'étiologie des diabètes.

Les organismes transgéniques selon l'Invention peuvent être utilisés pour la production de la protéine selon l'Invention.

20 La protéine selon l'Invention peut être purifiée selon les techniques connues de l'Homme du Métier. Ainsi, la protéine peut être purifiée à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc.. De préférence la protéine selon l'Invention est purifiée selon une méthode  
25 comprenant une première étape de séparation des protéines membranaires par centrifugation suivie d'une deuxième étape de purification par immunoaffinité selon la méthode décrite par T.C. Thomas, M.G. McNamee, (Purification of membrane proteins? Section IX, pp 499-520, in Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification, Edité par M.P. Deutscher, vol 182,  
30 Academic press, New-York, 1990").

L'Invention a également pour objet une méthode de préparation de la protéine ZnT-8 recombinante, se caractérisant en ce que l'on cultive les cellules transformées de la présente Invention, notamment les cellules de mammifères ou les organismes transgéniques selon l'Invention,

dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine recombinante.

L'Invention a également pour objet une protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par l'une quelconque des méthodes de préparation ci-dessus décrites.

La protéine obtenue comme indiqué ci-dessus, peut aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peut présenter ou non la structure tertiaire de la protéine naturelle.

Les Inventeurs ont également pu montrer que la structure secondaire de la protéine de l'Invention, par une étude du potentiel transmembranaire, présente 3 boucles d'acides aminés extracellulaires (acides aminés 96-106, 164-176, 241-245) contre lesquelles peuvent être développés des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

L'Invention a ainsi également pour objet des anticorps mono- ou polyclonaux caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement une protéine selon l'Invention.

De manière préférentielle selon l'Invention, les anticorps reconnaissent spécifiquement la protéine de séquence SEQ ID N°2 ou les protéines variantes selon l'Invention

Particulièrement, les anticorps selon l'Invention reconnaissent spécifiquement les boucles extracellulaires de la protéine selon l'Invention correspondant aux SEQ ID N°7, SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 (PEP1, PEP2 et PEP4) et/ou une boucle intracellulaire de la protéine selon l'Invention correspondant à la SEQ ID N°9 (PEP3).

Les anticorps selon l'Invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub>. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal délectable et/ou quantifiable.

Lesdits anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain, ou à partir de sérum d'animaux immunisés avec les protéines selon l'Invention, notamment celles produites par recombinaison génétique ou par synthèse peptidique. Ils peuvent également être éventuellement "humanisés".

Les anticorps polyclonaux spécifiques peuvent être obtenus



selon les modes opératoires usuels. Les anticorps monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes.

Un autre objet de l'Invention est une puce à protéine comprenant au moins un anticorps selon l'Invention.

5 L'Invention concerne aussi l'utilisation d'un anticorps selon l'Invention pour la préparation d'une puce à protéine comprenant ledit anticorps. L'Homme du Métier sait en fonction du support choisi, choisir la technique de réalisation appropriée pour réaliser une telle puce.

10 L'Invention a également pour objet l'utilisation des anticorps ou d'une puce à anticorps selon l'Invention pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'Invention, préférentiellement les boucles extracellulaires ou intracellulaires de ladite protéine, très préférentiellement les séquences correspondant aux SEQ ID N°7 à SEQ ID N° 10.

15 De manière générale, les anticorps de l'Invention peuvent être avantageusement utilisés dans toute situation où l'expression d'une protéine selon l'Invention, normale ou mutée, doit être observée.

20 Particulièrement, les anticorps monoclonaux, peuvent être utilisés pour la détection de ces protéines dans un échantillon biologique. Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des protéines selon l'Invention, notamment la protéine de séquence SEQ ID N°2 ou l'une de ses variantes, sur des coupes de tissus spécifiques. Généralement pour de telles analyses les anticorps utilisés sont marqués afin d'être détectables par exemple par des composés immunofluorescents, par marquage à l'or ou sous forme  
25 d'immunoconjugués enzymatiques.

Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces protéines dans les tissus ou prélèvements biologiques.

30 L'Invention a également pour objet une méthode de détection dans un échantillon biologique de la protéine ZnT-8, comprenant une première étape de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'Invention et une deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe antigène-anticorps formé.

L'Invention a également pour objet une trousse permettant de

mettre en oeuvre le procédé ci-dessus décrit comprenant :

a) au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'invention ;

5 b) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la trousse peut éventuellement comprendre des réactifs pour la constitution d'un milieu permettant la réaction immunologique.

10 Les anticorps selon l'invention peuvent également être utilisés pour la détection et/ou le tri des îlots de Langerhans, préférentiellement des cellules bêta, à partir de pancréas humain ou animal, notamment le pancréas de souris, rat, lapin et de porc. Ce tri peut être réalisé par un appareillage de cytométrie en flux (FACS) pour ce qui concerne les cellules isolées. Pour les îlots, leur marquage pourrait améliorer les méthodes de séparation actuelle :  
15 séparation par gradient de densité avec du Ficoll, de l'Euro-Ficoll ou du Ficoll-Diatrizoate de sodium ou la méthode de choix qui est un gradient d'albumine sur un séparateur de cellules.

Ainsi, l'invention a pour objet une méthode de sélection des cellules bêta des îlots de Langerhans, comprenant une première étape de mise  
20 en contact des cellules d'un échantillon biologique susceptible de contenir de tels îlots et/ou cellules avec un anticorps selon l'invention, une deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié des cellules marquées par l'anticorps et une troisième étape d'isolement par tout moyen approprié des marquées.

25 Les anticorps selon l'invention peuvent également être utilisés pour suivre le processus de différenciation de cellules souches en cellules bêta des îlots de Langerhans, particulièrement humaines ou animales, ainsi que de trier ces cellules exprimant la protéine ZnT-8, particulièrement la protéine de séquence SEQ ID N°2 après différenciation.

30 Ainsi, l'invention a pour objet une méthode pour suivre le processus de différenciation de cellules souches en cellules d'îlot pancréatique ou en cellules bêta, comprenant une étape de mise en contact des cellules d'un échantillon biologique susceptible de contenir lesdites cellules souches en cours de différenciation avec un anticorps selon l'invention, une deuxième

étape de mise en évidence par tout moyen approprié des cellules marquées par l'anticorps et une troisième étape de visualisation par tout moyen approprié des cellules marquées.

5 Ladite méthode peut en outre comprendre une étape supplémentaire d'isolement par tout moyen approprié des cellules marquées.

Le polynucléotide, la cellule, l'organisme transgénique ou la puce à ADN selon l'invention peuvent être utilisés pour le criblage de composés chimiques ou biochimiques pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide selon l'invention et/ou  
10 moduler l'expression et/ou dudit polynucléotide.

Ainsi, l'invention a pour objet une méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide selon l'invention caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un  
15 composé chimique ou biochimique candidat et le polynucléotide, la cellule, l'organisme transgénique ou la puce à ADN selon l'invention et que dans une deuxième étape on détecte le complexe formé entre le composé chimique ou biochimique candidat et le polypeptide, la cellule, l'organisme transgénique ou la puce à ADN selon l'invention.

20 L'invention a aussi pour objet une méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant moduler *in vitro* ou *in vivo*, directement ou indirectement, l'expression et/ou l'activité du polynucléotide selon l'invention, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et la protéine, la cellule,  
25 l'organisme transgénique ou la puce à ADN selon l'invention et que dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'expression et/ou l'activité dudit polypeptide.

La protéine, la cellule, l'organisme transgénique ou la puce à protéine selon l'invention peuvent être utilisés pour le criblage de composés  
30 chimiques ou biochimiques pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo*, directement ou indirectement, avec la protéine selon l'invention, et/ou qui peuvent moduler l'expression ou l'activité de ladite protéine.

Ainsi, l'invention a pour objet une méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo*  
35 directement ou indirectement, avec la protéine selon l'invention, caractérisée

en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et la protéine, la cellule, l'organisme transgénique ou la puce à protéine selon l'Invention et que dans une deuxième étape on détecte le complexe formé entre le composé chimique ou biochimique candidat et la protéine, la cellule, l'organisme transgénique ou la puce à protéine selon l'Invention.

L'Invention a aussi pour objet une méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant moduler *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement, l'expression et/ou l'activité de la protéine selon l'Invention, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et la protéine, la cellule, l'organisme transgénique ou la puce à protéine selon l'Invention et que dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'expression et/ou l'activité de ladite protéine.

L'Invention a également pour objet le polynucléotide, la protéine, les anticorps, les vecteurs ou les cellules transformées, selon l'Invention, utilisés comme médicaments.

Le polynucléotide, la protéine, les anticorps, les vecteurs ou les cellules transformées, selon l'Invention, peuvent être utilisés dans la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du diabète, particulièrement celui associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N°1, et/ou à une expression anormale de la protéine correspondant à SEQ ID N°2, ou destiné à la prévention et/ou au traitement des hyperinsulinismes lorsque l'on observe une expression, une maturation ou une sécrétion anormale du gène de l'insuline, ou destiné à réguler la maturation et la sécrétion de l'insuline dans les cellules bêta et ou dans des cellules modifiées en vue d'une sécrétion d'insuline ou destiné à réguler les phénomènes d'apoptose des cellules bêta.

Une expression anormale signifie une surexpression, une sous-expression ou l'expression d'une protéine mutée. Une maturation anormale signifie une protéolyse absente ou insuffisante de la pro-insuline en insuline ou une co-cristallisation absente, insuffisante ou trop importante de l'insuline et du zinc dans les vésicules de sécrétion intracellulaires.

L'Invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide, d'une protéine ou d'un anticorps selon l'Invention pour

déterminer une variabilité allélique, une mutation, une délétion, une perte d'hétérozygotie ou toute anomalie génétique du gène codant pour le polynucléotide selon l'Invention. On peut détecter les mutations dans la séquence du gène *ZnT-8* directement par analyse de l'acide nucléique et des séquences selon l'Invention (ADN génomique, ARN, ou ADNc), mais également par l'intermédiaire des protéines selon l'Invention. En particulier, l'utilisation d'un anticorps selon l'Invention qui reconnaît un épitope portant une mutation permet de discriminer entre une protéine "saine" et une protéine "associée à une pathologie".

L'Homme du Métier sait également mettre en oeuvre des techniques permettant l'étude de l'altération de l'expression d'un gène, par exemple par l'étude de l'ARNm (en particulier par Northern Blot ou par des expériences de RT-PCR), avec des sondes ou des amorces selon l'Invention ou de la protéine exprimée, en particulier par Western Blot, en utilisant des anticorps selon l'Invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre de l'Invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- La Figure 1 représente l'expression tissulaire de l'ARN messager correspondant au polynucléotide de l'Invention.

Une expression dudit ARNm n'est mise en évidence que dans le pancréas.

- La Figure 2 représente l'expression de l'ARN messager correspondant au polynucléotide de l'Invention dans les cellules souches mésenchymateuses, dans le pancréas fœtal et dans les îlots pancréatiques humains. L'ARNm est détecté dans le pancréas et les îlots fœtaux, alors qu'aucun transcrit n'est retrouvé dans les cellules souches. L'actine est utilisée comme contrôle.

- La Figure 3 représente des cellules HeLa transfectées par une construction exprimant la protéine de fusion ZnT-8-GFP. La fluorescence est localisée dans des vésicules intracytoplasmiques, ainsi que sur la membrane plasmique.

Les exemples suivants sont illustratifs de l'Invention et ne la

limitent aucunement.

**Exemple 1 : Clonage du polypeptide de séquence SEQ ID N°1**

L'identification du gène a été réalisée par bioinformatique, par  
5 recherche d'homologie des protéines de la famille ZnT déjà décrites dans la  
littérature, en utilisant les séquençages du HGP (human Genome Project).  
L'analyse des séquences génomiques a permis de définir les différents  
éléments du gène (intron/exon). Une première série d'amorces définies dans le  
gène (SEQ ID N°3 et 4) a permis de confirmer l'expression du gène, et ceci de  
10 façon spécifique dans le pancréas (voir exemple 2). L'analyse de la séquence  
a permis de définir les amorces en 3' et 5' utilisées pour le clonage complet à  
savoir les amorces SEQ ID N°5 : 5'-ACT CTA GAA TGG AGT TTC TTG AAA  
GAA CGT A et SEQ ID N°6 : 5'-AAT CTA GAG TCA CAG GGG TCT TCA CAG  
A.

15 La séquence codant pour ZnT-8 a été amplifiée par RTPCR à  
partir d'ARNm d'îlots de pancréas humains.

Les ARN totaux sont extraits à partir des îlots par le kit "RNA  
extraction kit" (Roche, Meylan, France) comme décrit par le fabricant. Les ARN  
sont quantifiés par spectrophotométrie à 250 nm et des échantillons sont  
20 conservés à -80°C.

L'amplification est réalisée avec le kit "Titan one tube RT-PCR  
kit" (Roche, Meylan, France) avec les amorces décrites (SEQ ID N°5 et 6). La  
transcription reverse est réalisée à 52°C pendant 30 min et les ADNc ainsi  
produits sont amplifiés par 30 cycles (30 s à 94°C, 30 s à 53°C, 1 min à 72°C)  
25 et une élongation finale de 5 min à 72°C. Les produits sont vérifiés ensuite par  
dépôt sur un gel d'agarose (1,5%) en présence de bromure d'éthidium et  
séparés par électrophorèse. Le produit de PCR de 1123 paires de bases  
comprenant la séquence SEQ ID N°1 (ZnT-8) est purifié à l'aide du kit Nucleic  
acid purification kit (QIAGEN)

30 **Exemple 2 : Expression de l'ARN messager correspondant  
au polynucléotide de l'invention dans différents tissus**

L'expression de l'ARN messager correspondant au  
polynucléotide de l'invention a été étudiée par RT-PCR à partir d'échantillons  
d'ARNm totaux de différents tissus humains en utilisant les amorces suivantes :

SEQ ID N°3 : 5'-GAT GCT GCC CAC CTC TTA ATT GAC et SEQ ID No4 : 5'-TCA TCT TTT CCA TCC TGG TCT TGG.

Les amorces (SEQ ID N°3 et 4) ont été choisies dans 2 exons différents pour éviter l'amplification d'une séquence génomique. L'analyse de l'expression de l'ARN messager correspondant au polypeptide de l'invention a été réalisée par PCR sur des ADNc commerciaux préparés à partir de différents tissus humains. 2µl d'ADNc sont mélangés avec les 2 amorces spécifiques (1µM final) et un mélange classique de PCR (1 unité de Taq DNA polymerase, tampon avec 1,5 mM magnésium, dNTP 10mM). L'amplification est réalisée par 30 cycles (30 s à 94°C, 30 s à 53°C, 1 min à 72°C) et une étape finale d'élongation de 5 min à 72°C. Les produits sont ensuite analysés par dépôt sur un gel d'agarose (1,5%) en présence de bromure d'éthidium et séparés par électrophorèse.

Les tissus testés sont : 1 : Cerveau, 2 : Cœur, 3 : Rein, 4 : Rate, 5 : Foie, 6 : Colon, 7 : Poumon, 8 : intestin grêle, 9 : Muscle, 10 : Estomac, 11 : Testicule, 12 : Placenta, 13 : Glande salivaire, 14 : Thyroïde, 15 : Corticosurrénale, 16 : Pancréas, 17 : Ovaire, 18 : Utérus, 19 : Prostate, 20 : Peau, 21 : Leucocytes sanguins, 22 : Moelle osseuse, 23 : Cerveau fœtal, 24 : Foie fœtal.

La Figure 1 représente les résultats obtenus.

L'ARNm correspondant au polynucléotide de l'invention (Figure 1A) n'est exprimé que dans les cellules de pancréas humain adulte (16).

L'ARNm n'est pas exprimé dans les 23 autres tissus étudiés.

La figure 1B représente le contrôle actine.

**Exemple 3 : Expression de l'ARN messager correspondant au polynucléotide de l'invention dans des cellules souches mésenchymateuses et des cellules de pancréas fœtal**

L'analyse de l'expression de l'ARN messager correspondant au polypeptide de l'invention a été réalisée par RTPCR sur des ARN préparés à partir de différents tissus humains : îlots pancréatiques humains adultes ou fœtaux, cellules mésenchymateuses humaines. 10<sup>6</sup> cellules sont lavées deux fois avec du tampon phosphate (PBS), puis centrifugées 3 min à 2000 g. Les ARN totaux sont extraits à partir du culot cellulaire par le kit "RNA extraction kit" (Roche, Meylan, France) comme décrit par le fabricant. Les ARN sont

quantifiés par spectrophotométrie à 250 nm et des échantillons sont conservés à -80°C. Pour l'analyse par RT-PCR, la concentration des ARN est ajustée à 1 ng/µl pour ZnT-8 ou 1 pg/µl pour le contrôle β-actin. Les transcrits sont amplifiés avec le kit "Titan one tube RT-PCR kit" (Roche, Meylan, France) avec les amorces décrites ci-dessus (SEQ ID N°3 et 4). La transcription reverse est réalisée à 52°C pendant 30 min et les ADNc ainsi produits sont amplifiés par 30 cycles (30 s à 94°C, 30 s à 53°C, 1 min à 72°C) et une élongation finale de 5 min à 72°C. Les produits sont ensuite analysés par dépôt sur un gel d'agarose (1,5%) en présence de bromure d'éthidium et séparés par électrophorèse.

La Figure 2 représente les résultats obtenus.

L'ARNm correspondant au polynucléotide de l'invention est exprimé dans les cellules de pancréas foetal et dans les cellules d'îlots pancréatiques humains mais n'est pas exprimé dans les cellules mésenchymateuses humaines.

#### Exemple 4 : Expression d'une protéine de fusion GFP

La protéine est la protéine humaine, codée par l'ADNc correspondant à la séquence SEQ ID N°1 (ZnT-8). Le produit de PCR de 1123 paires de bases obtenu selon l'exemple 1 est coupé avec l'enzyme de restriction XbaI, puis inséré dans le vecteur pcDNA3.1-CT-GFP (Invitrogen). Le vecteur ainsi obtenu, pZnT-8-GFP est séquencé pour vérification.

Les cellules épithéliales HeLa (ATCC numéro CCL-2) sont cultivées dans le milieu Opti-MEM (Modified Eagle's Medium, Life Technologies, Inc.) supplémenté avec 5% de sérum de veau décomplémenté et 2 mM de glutamine. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée enrichie à 5% en CO<sub>2</sub>. Les transfections sont réalisées dans des boîtes de Pétri de 35 mm avec le vecteur pZnT-8-GFP et le produit Exgen500 (Euromedex, France) selon les instructions du fabricant (1µg d'ADN pour 10<sup>6</sup> cellules). L'expression de la protéine de fusion ZnT-8-GFP est observée 48 heures après la transfection, sous un microscope à fluorescence inversé (Axiovert, Zeiss) en utilisant les paramètres suivants : longueur d'onde d'excitation : 450-490 nm ; longueur d'onde d'émission : 520 nm.

La Figure 3 représente le résultat obtenu. La fluorescence est localisée dans des vésicules intracytoplasmiques, ainsi que sur la membrane



plasmique. Cela démontre que cette protéine emprunte la voie d'excrétion extracellulaire et se retrouve à la surface de la cellule.

#### Exemple 5 : Analyse de la protéine ZnT-8

5 L'analyse de la séquence primaire de ZnT-8 et la prédiction des domaines transmembranaires ont été réalisées avec les programmes TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) et SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/menu0.html>).

10 La protéine ZnT-8 complète possède 6 domaines transmembranaires prédits (acides aminés 74-95, 107-126, 141-163, 177-196, 216-240, 246-267), les extrémités N- et C-terminales étant situées dans le cytoplasme.

#### Exemple 6 : Préparation d'un anticorps polyclonal dirigé contre les boucles extracellulaires (PEP1, PEP2 et PEP4) et contre une boucle intracellulaire (PEP3) de ZnT-8

15 Les peptides comportant les épitopes correspondants aux SEQ ID N°7 : PEP1 : HIAGSLAVVTDAAHLL ; SEQ ID N°8 : PEP2 : CERLLYPDYQIQATV ; SEQ ID N°9 : PEP3 CLGHNHKEVQANASVR, SEQ ID N°10 : PEP4 : YFKPEYKIADPIC, sont synthétisés sur un appareil pour  
20 synthèse peptidique sur support solide, purifiés et conjugués sur une protéine porteuse (albumine, par exemple). L'ensemble est injecté aux lapins selon le schéma d'immunisation suivant :

J0 : première immunisation ; J14 : seconde immunisation ; J28 : Troisième immunisation ; J38 : vérification de la spécificité ; J56 : quatrième immunisation ; J66 et J80 : récupération du sérum. Le sérum, peut être utilisé  
25 directement ou après purification sur colonne de protéine A avec une élution en milieu acide. Ces opérations ont été effectuées à façon par la société Eurogentec SA, Belgique.

#### Exemple 7 : Marquage fluorescent de l'anticorps obtenu à l'exemple 6

30 L'anticorps est purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine G (Pharmacia). La colonne (1ml), équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 est chargée avec 5 ml de sérum, puis lavée avec 20 ml du même tampon pour éluer les protéines

non fixées. L'anticorps est ensuite décroché avec une solution de glycine, HCl 0,1M, pH 2,5, puis neutralisé par 40µl de tampon Tris HCl 2M, pH 10,0.

2 mg d'anticorps sont mélangés à 1 ml de tampon phosphate pH 8.0. Une solution fraîche à 1mg/ml de NHS-FITC est préparée dans du DMSO. On mélange 75 µl de la solution FITC/DMSO à la solution d'anticorps. On incube le mélange à température ambiante pendant 45 minutes. La purification est réalisée sur colonne PD-10. La colonne est lavée avec 30ml de PBS, puis 1ml de la solution FITC-Ig à purifier. On applique 5 ml de PBS sur la colonne et on collecte des fractions de 2 ml. La seconde fraction contient l'anticorps.

Les produits sont disponibles chez SIGMA.

## Références bibliographiques

1. Soria B. : In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 2001 ; 68 : 205-19.
- 5 2. Gores PF, Sutherland DE. Pancreatic islet transplantation : is purification necessary ? *Am. J. Surg.* 1993 ; 166 : 538-42.
3. Bloc A, Cens T, Cruz H, Dunant Y. Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic-cells : activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Physiol.* 2000 ; 529 Pt 3 : 723-34.
- 10 4. Meyer K, Irminger JC, Moss LG, de Vargas LM, Oberholzer J, Bosco D, et al. : Sorting human beta-cells consequent to targeted expression of green fluorescent protein. *Diabetes* 1998 ; 47 : 1974-7.
- 15 5. Giordano C, Stassi G, Todaro M, Richiusa P, Giordano M, Mattina A, et al. : Autofluorescence-activated sorting of human single beta cells and endocrine non-beta cells after enzymatic islet dissociation. *Transplant Proc* ; 1994 ; 26 : 651-2.
- 20 6. Lukowiak B, Vandewalle B, Riachy R, Kerr-Conte J, Gmyr V, Belaich S, et al. : Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc fluorescent probe. *J. Histochem. Cytochem.* 2001 ; 49 : 519-28.
- 25 7. Shiroy A, Yoshikawa M., Yokota H., Fukui H., Ishizaka S., Tatsumi K, et al. : Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone. *Stem Cells* 2002 ; 20 : 284-292.
8. Jiao L, Gray DW, Gohde W, Flynn GJ, Morris PJ. In vitro staining of islets of Langerhans for fluorescence-activated cell sorting. *Transplantation* 1991 ; 52 : 450-2.
- 30 9. Kallan AA, Roep BO, Arden SD, Hutton JC, de Vries RR. : Beta-cell reactive T-cell clones from type I diabetes patients are not beta cell specific and recognize multiple antigens. *J. Autoimmun.* 1995 ; 8 : 887-99.

10. Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH et al. : Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.* 1994 ; 42 : 877-84.
- 5                    11. Easom RA. Beta-granule transport and exocytosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2000 ; 11 : 253-66.
12. Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J.* 1995 ; 14 : 639-49.
- 10                    13. Sambrook J, Russell DW. (2000) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
14. Bloc A et al, *J Physiol.* 2000, Dec. 15 ; 529 Pt 3 : 723-34)

## REVENDICATIONS

1) Polynucléotide isolé, comprenant ou répondant à une séquence choisie dans le groupe de séquences suivantes :

5

a) La séquence SEQ ID N°1 ;

b) Un fragment de la séquence SED ID N°1 d'au moins 15 nucléotides consécutifs, à l'exception des EST présentant les numéros d'accès dans la base de données GenBank BM565129, BM310003, BM875526, BG655918, BQ417284, BQ267316, BU072134, BQ267526, 10 BQ270198, BU581447, BU070173 et BQ631692 ;

c) Un acide nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% après alignement optimal avec l'une des séquences définies en a) ou en b) ;

d) Un acide nucléique s'hybridant dans des conditions 15 d'hybridation de forte stringence avec l'une des séquences définies en a) ou en b) ;

e) Un acide nucléique complémentaire, sens ou antisens de l'une des séquences définies en a), b), c) ou d).

2) Polynucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce 20 qu'il s'agit d'un polynucléotide variant de la séquence SEQ ID N°1.

3) Polynucléotide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide porteur d'au moins une mutation conduisant à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine codée par la séquence SEQ ID N°1.

25 4) Sonde pour détecter, identifier ou doser dans d'autres organismes des acides nucléiques correspondants, caractérisée en ce qu'elle est constituée du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

30 5) Amorces pour l'amplification d'acides nucléiques correspondants, caractérisées en ce qu'elles sont constituées du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, préférentiellement ceux correspondants aux paires d'amorces SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6

## REVENDICATIONS

1) Polynucléotide isolé, comprenant ou répondant à une séquence choisie dans le groupe de séquences suivantes :

a) La séquence SEQ ID N°1 ;

5           b) Un fragment de la séquence SED ID N°1 d'au moins 15 nucléotides consécutifs, à l'exception des EST présentant les numéros d'accession dans la base de données GenBank BM565129, BM310003, BM875526, BG655918, BQ417284, BQ267316, BU072134, BQ267526, BQ270198, BU581447, BU070173 et BQ631692 ;

10           c) Un acide nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% après alignement optimal avec l'une des séquences définies en a) ou en b) ;

            d) Un acide nucléique s'hybridant dans des conditions d'hybridation de forte stringence avec l'une des séquences définies en a) ou en b) ;

15           e) Un acide nucléique complémentaire, sens ou antisens de l'une des séquences définies en a), b), c) ou d).

2) Polynucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide variant de la séquence SEQ ID N°1.

20           3) Polynucléotide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide porteur d'au moins une mutation conduisant à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine codée par la séquence SEQ ID N°1.

25           4) Sonde pour détecter, identifier ou doser dans d'autres organismes des acides nucléiques correspondants, caractérisée en ce qu'elle est constituée du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

30           5) Amorces pour l'amplification d'acides nucléiques correspondants, caractérisées en ce qu'elles sont constituées du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, préférentiellement ceux correspondants aux paires d'amorces SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6.

6) Polynucléotide susceptible d'être obtenu par amplification à l'aide des amorces selon la revendication 5.

6) Polynucléotide susceptible d'être obtenu par amplification à l'aide des amorces selon la revendication 5.

7) Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un oligonucléotide sens correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression dudit polynucléotide, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

8) Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un petit ARN interférent (siRNA) correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, qui par interaction avec les ARNm correspondants audit polynucléotide, conduiront à leur dégradation.

9) Méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde marquée constituée d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 dans des conditions appropriées d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

10) Méthode selon la revendication 9, dans laquelle la deuxième étape est une étape de rétrotranscription et/ou d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 5 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés.

11) Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement choisi.

12) Méthode de mise en évidence du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou des variants alléliques dudit gène ou d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par

7) Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un petit ARN interférent (siRNA) correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, qui par interaction avec les ARNm correspondants audit polynucléotide, conduiront à leur dégradation.

8) Méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde marquée constituée d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 dans des conditions appropriées d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

9) Méthode selon la revendication 8, dans laquelle la deuxième étape est une étape de rétrotranscription et/ou d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 5 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés.

10) Méthode selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement choisi.

11) Méthode de mise en évidence du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou des variants alléliques dudit gène ou d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde marquée constituée d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 dans des conditions appropriées d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

12) Méthode selon la revendication 11, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 5 et la troisième étape une étape de révéla-



5 tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde marquée constituée d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 dans des conditions appropriées d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

10 13) Méthode selon la revendication 12, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 5 et la troisième étape une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

14) Méthode selon l'une quelconque des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

15 14) Méthode selon l'une quelconque des revendications 12 à 14 pour l'obtention d'un allèle du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, associé à un phénotype détectable.

16) Trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes selon l'une quelconque des revendications 9 à 15 comprenant :

20 a) au moins une sonde selon la revendication 4 et/ou une paire d'amorces selon la revendication 5 ;

b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

25 c) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification ;

d) les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

30 17) Puce à ADN comprenant au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 6 ou 7.

18) Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 6 ou 7 pour la préparation d'une puce à ADN.

tion par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

13) Méthode selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

5 14) Méthode selon l'une quelconque des revendications 11 à 13 pour l'obtention d'un allèle du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, associé à un phénotype détectable.

10 15) Trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 comprenant :

a) au moins une sonde selon la revendication 4 et/ou une paire d'amorces selon la revendication 5 ;

15 b) les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

c) les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification ;

20 d) les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

16) Puce à ADN comprenant au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou 6.

17) Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou 6 pour la préparation d'une puce à ADN.

25 18) Utilisation *in vitro* du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 6 ou 7, comme moyen d'étude

a) de la surexpression du transporteur dans des lignées de cellules modèles et de l'impact sur la sécrétion de l'insuline en réponse à une stimulation par le glucose ;

30 b) de la sensibilité des cellules à la mort cellulaire (apoptose) induite par des conditions de stress oxydant ou de concentration faible ou forte en zinc ;

19) Utilisation *in vitro* du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 à 8, comme moyen d'étude

5 a) de la surexpression du transporteur dans des lignées de cellules modèles et de l'impact sur la sécrétion de l'insuline en réponse à une stimulation par le glucose ;

b) de la sensibilité des cellules à la mort cellulaire (apoptose) induite par des conditions de stress oxydant ou de concentration faible ou forte en zinc ;

10 c) des étapes de différenciation de cellules souches en cellules sécrétrices d'insuline en réponse à différentes stimulations exogène.

20) Protéine isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend ou répond à une protéine choisie parmi :

a) la protéine de séquence SEQ ID N°2 ;

15 b) une protéine comportant au moins 60 % d'identité après alignement optimal avec ladite protéine ou au moins 65 % de similarité, de préférence 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, ou de manière encore plus préférée 90% d'identité ou au moins 95% de similarité avec la protéine de séquence SEQ ID N°2 ;

20 c) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'une protéine définie en a) ou b).

21) Protéine selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence SEQ ID N°2 ou à une séquence possédant au moins 80 % d'identité avec SEQ ID N°2 après alignement optimal.

25 22) Protéines variantes de la séquence SEQ ID N°2, préférentiellement présentant une mutation liée à un diabète ou à un hyperinsulinisme.

23) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est codée par un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6.

30 24) Fragment de la protéine selon la revendication 20 répondant à l'une des séquences SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 ou SEQ ID N°10,

25) Puce à protéine comprenant au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24.

c) des étapes de différenciation de cellules souches en cellules sécrétrices d'insuline en réponse à différentes stimulations exogène.

19) Protéine isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend ou répond à une protéine choisie parmi :

5 a) la protéine de séquence SEQ ID N°2 ;

b) une protéine comportant au moins 60 % d'identité après alignement optimal avec ladite protéine ou au moins 65 % de similarité, de préférence 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, ou de manière encore plus préférée 90% d'identité ou au moins 95% de similarité avec la  
10 protéine de séquence SEQ ID N°2 ;

c) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'une protéine définie en a) ou b).

20) Protéine selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence SEQ ID N°2 ou à une séquence possédant au  
15 moins 80 % d'identité avec SEQ ID N°2 après alignement optimal.

21) Protéines variantes de la séquence SEQ ID N°2, préférentiellement présentant une mutation liée à un diabète ou à un hyperinsulinisme.

22) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est codée par un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6.

20 23) Fragment de la protéine selon la revendication 19 répondant à l'une des séquences SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 ou SEQ ID N°10,

24) Puce à protéine comprenant au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23.

25 25) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 pour la préparation d'une puce à protéine.

26) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou d'une puce à protéine selon la revendication 24 pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre la protéine dans le sérum d'un  
30 individu.

27) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 pour des mesures par des méthodes immunochimiques

26) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 pour la préparation d'une puce à protéine.

27) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou d'une puce à protéine selon la revendication 25 pour  
5 détecter la présence d'anticorps dirigés contre la protéine dans le sérum d'un individu.

28) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 pour des mesures par des méthodes immunochimiques et immunoenzymatiques, ou pour la recherche d'auto-anticorps dirigés contre  
10 la protéine.

29) Vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 6 à  
8.

30) Cellule transformée dans laquelle au moins un  
15 polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 à 8 ou au moins un vecteur selon la revendication 29 a été introduit.

31) Organismes transgéniques, dont tout ou partie des cellules contient un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou  
20 6 à 8 ou au moins un vecteur selon la revendication 29, sous une forme libre ou intégrée.

32) Utilisation d'une cellule transformée selon la revendication 30 ou d'un organisme transgénique selon la revendication 31, pour la production d'une protéine décrite dans l'une quelconque des revendications 20  
à 24.

33) Méthode de préparation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, se caractérisant en ce que l'on cultive les cellules transformées selon la revendication 30, notamment les cellules de  
25 mammifères, ou les organismes transgéniques selon la revendication 31, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie  
30 ladite protéine recombinante.

34) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par la méthode de production selon la revendication 33.

35) Anticorps mono- ou polyclonal caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement une protéine selon l'une quelconque

et immunoenzymatiques, ou pour la recherche d'auto-anticorps dirigés contre la protéine.

28) Vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 6 ou 7.

29) Cellule transformée dans laquelle au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 6 ou 7 ou au moins un vecteur selon la revendication 28 a été introduit.

30) Organismes transgéniques non-humains, dont tout ou partie des cellules contient un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 6 ou 7 ou au moins un vecteur selon la revendication 28, sous une forme libre ou intégrée.

31) Utilisation d'une cellule transformée selon la revendication 29 ou d'un organisme transgénique non-humain selon la revendication 30, pour la production d'une protéine décrite dans l'une quelconque des revendications 19 à 23.

32) Méthode de préparation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23, se caractérisant en ce que l'on cultive les cellules transformées selon la revendication 29, notamment les cellules de mammifères, ou les organismes transgéniques non-humains selon la revendication 30, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine recombinante.

33) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par la méthode de production selon la revendication 32.

34) Anticorps mono- ou polyclonal caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33.

35) Anticorps selon la revendication 34, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la protéine de séquence SEQ ID N°2 ou une protéine variante.

36) Anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement les boucles extracellulaires de la protéine selon l'invention correspondant aux SEQ ID N°7, SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 (PEP1, PEP2 et PEP 4) et/ou une boucle intracellulaire de la

des revendications 20 à 24 ou 34.

36) Anticorps selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la protéine de séquence SEQ ID N°2 ou une protéine variante.

5 37) Anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 ou 36, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement les boucles extracellulaires de la protéine selon l'invention correspondant aux SEQ ID N°7, SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 (PEP1, PEP2 et PEP 4) et/ou une boucle intracellulaire de la protéine selon l'invention correspondant à la SEQ ID N°9 (PEP3).

10 38) Puce à protéine comprenant au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37.

39) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37 pour la préparation d'une puce à protéine.

15 40) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37 ou d'une puce selon la revendication 38 pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34, préférentiellement les boucles extracellulaires de la protéine selon l'invention correspondant aux SEQ ID N°7, SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 (PEP1, PEP2 et PEP 4) et/ou une boucle intracellulaire de la  
20 protéine selon l'invention correspondant à la SEQ ID N°9 (PEP3).

41) Procédé de détection d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34 dans un échantillon biologique, comprenant une première étape de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37 et une  
25 deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe antigène-anticorps formé.

42) Trousse permettant de mettre en oeuvre le procédé selon la revendication 41 comprenant :

a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une  
30 quelconque des revendications 35 à 37 ;

b) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

43) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des

protéine selon l'invention correspondant à la SEQ ID N°9 (PEP3).

37) Puce à protéine comprenant au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36.

38) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36 pour la préparation d'une puce à protéine.

39) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36 ou d'une puce selon la revendication 37 pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33, préférentiellement les boucles extracellulaires de la protéine selon l'invention correspondant aux SEQ ID N°7, SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 (PEP1, PEP2 et PEP 4) et/ou une boucle intracellulaire de la protéine selon l'invention correspondant à la SEQ ID N°9 (PEP3).

40) Procédé de détection d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33 dans un échantillon biologique, comprenant une première étape de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 37 et une deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe antigène-anticorps formé.

41) Trousse permettant de mettre en oeuvre le procédé selon la revendication 40 comprenant :

a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une quelconque des revendications 34 à 36 ;

b) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

42) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37 pour la détection et/ou le tri des îlots de Langerhans ou bien des cellules bêta.

43) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36 pour suivre le processus de différenciation de cellules souches en cellules d'îlot pancréatique, préférentiellement en cellules bêta.

44) Méthode de sélection des cellules bêta des îlots de Langerhans, comprenant une première étape de mise en contact des cellules d'un échantillon biologique susceptible de contenir de tels îlots et/ou cellules



revendications 35 à 37 pour la détection et/ou le tri des îlots de Langerhans ou bien des cellules bêta.

Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37 pour suivre le processus de différenciation de cellules souches en cellules d'îlot pancréatique, préférentiellement en cellules bêta.

44) Méthode de sélection des cellules bêta des îlots de Langerhans, comprenant une première étape de mise en contact des cellules d'un échantillon biologique susceptible de contenir de tels îlots et/ou cellules avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37, une deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié des cellules marquées par l'anticorps et une troisième étape d'isolement par tout moyen approprié des cellules marquées.

45) Méthode pour suivre le processus de différenciation de cellules souches en cellules d'îlot pancréatique ou en cellules bêta, comprenant une étape de mise en contact des cellules d'un échantillon biologique susceptible de contenir lesdites cellules souches en cours de différenciation avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37, une deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié des cellules marquées par l'anticorps et une troisième étape de visualisation par tout moyen approprié des cellules marquées.

46) Méthode selon la revendication 46 comprenant en outre une étape supplémentaire d'isolement par tout moyen approprié des cellules marquées.

47) Méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement avec le polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou une cellule selon la revendication 30 ou une puce à ADN selon la revendication 17, et que dans une deuxième étape on détecte le complexe formé entre le composé chimique ou biochimique candidat et le polynucléotide ou la cellule ou l'organisme transgénique ou la puce à ADN.

48) Méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant moduler *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement

avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36, une deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié des cellules marquées par l'anticorps et une troisième étape d'isolement par tout moyen approprié des cellules marquées.

5 45) Méthode pour suivre le processus de différenciation de cellules souches en cellules d'îlot pancréatique ou en cellules bêta, comprenant une étape de mise en contact des cellules d'un échantillon biologique susceptible de contenir lesdites cellules souches en cours de différenciation avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36, une  
10 deuxième étape de mise en évidence par tout moyen approprié des cellules marquées par l'anticorps et une troisième étape de visualisation par tout moyen approprié des cellules marquées.

46) Méthode selon la revendication 45 comprenant en outre une étape supplémentaire d'isolement par tout moyen approprié des cellules  
15 marquées.

47) Méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement avec le polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un  
20 composé chimique ou biochimique candidat et un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou une cellule selon la revendication 30 ou une puce à ADN selon la revendication 16, et que dans une deuxième étape on détecte le complexe formé entre le composé chimique ou biochimique candidat et le polynucléotide ou la cellule ou la puce à ADN.

25 48) Méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant moduler *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et un polynucléotide selon l'une  
30 quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou une cellule selon la revendication 29 ou une puce à ADN selon la revendication 16, et que dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6.

49) Méthode de criblage d'un composé chimique ou  
35 biochimique pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement

l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou une cellule selon la revendication 30 ou une puce à ADN selon la revendication 17, et que dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6.

49) Méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant interagir *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement avec la protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34 ou une cellule selon la revendication 30 ou une puce à protéine selon la revendication 25 et que dans une deuxième étape on détecte le complexe formé entre le composé chimique ou biochimique candidat et la protéine ou la cellule ou l'organisme transgénique ou la puce à protéine.

50) Méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant moduler *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement l'expression et/ou l'activité de la protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34 ou une cellule selon la revendication 30 ou une puce à protéine selon la revendication 25 et que dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'expression et/ou l'activité de ladite protéine.

51) Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 à 8 ou protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37 ou vecteurs selon la revendication 29 ou cellules transformées selon la revendication 30, utilisés comme médicaments.

52) Utilisation du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 à 8, de la protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34, de l'anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37, de vecteurs selon la revendication 29 ou de cellules

avec la protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33 ou une cellule selon la revendication 29 ou une puce à protéine selon la revendication 24 et que dans  
 5 une deuxième étape on détecte le complexe formé entre le composé chimique ou biochimique candidat et la protéine ou la cellule ou la puce à protéine.

50) Méthode de criblage d'un composé chimique ou biochimique pouvant moduler *in vitro* ou *in vivo* directement ou indirectement  
 10 l'expression et/ou l'activité de la protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33, caractérisée en ce que dans une première étape on met en contact un composé chimique ou biochimique candidat et une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33 ou une cellule selon la revendication 29 ou une puce à protéine selon la revendication 24 et que  
 15 dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'expression et/ou l'activité de ladite protéine.

51) Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 à 8 ou protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36 ou  
 20 vecteurs selon la revendication 28 ou cellules transformées selon la revendication 29, utilisés comme médicaments.

52) Utilisation du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 à 8, de la protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33, de l'anticorps selon l'une quelconque des  
 25 revendications 34 à 36, de vecteurs selon la revendication 28 ou de cellules transformées selon la revendication 29, dans la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du diabète, particulièrement celui associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N°1, et/ou à une expression anormale de la protéine correspondant à SEQ  
 30 ID N°2, ou destiné à la prévention et/ou au traitement des hyperinsulinismes lorsque l'on observe une expression, une maturation ou une sécrétion anormale du gène de l'insuline ou destiné à réguler la maturation et/ou la sécrétion de l'insuline dans les cellules bêta ou dans des cellules modifiées en vue d'une sécrétion d'insuline, ou destiné à réguler les phénomènes d'apop-  
 35 tose des cellules bêta.

transformées selon la revendication 30, dans la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du diabète, particulièrement celui associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N°1, et/ou à une expression anormale de la protéine correspondant à SEQ ID N°2, ou destiné à la prévention et/ou au traitement des hyperinsulinismes lorsque l'on observe une expression, une maturation ou une sécrétion anormale du gène de l'insuline ou destiné à réguler la maturation et/ou la sécrétion de l'insuline dans les cellules bêta ou dans des cellules modifiées en vue d'une sécrétion d'insuline, ou destiné à réguler les phénomènes d'apoptose des cellules bêta.

53) Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou 34 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 35 à 37, pour déterminer une variabilité allélique, une mutation, une délétion, une perte d'hétérozygotie ou toute anomalie du gène codant pour ledit polynucléotide.

- 53) Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 6 ou d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 19 à 23 ou 33 ou un anticorps selon l'une quelconque des revendications 34 à 36, pour déterminer une variabilité allélique, une mutation, une délétion, une perte d'hétérozygotie ou toute anomalie du gène codant pour ledit polynucléotide.

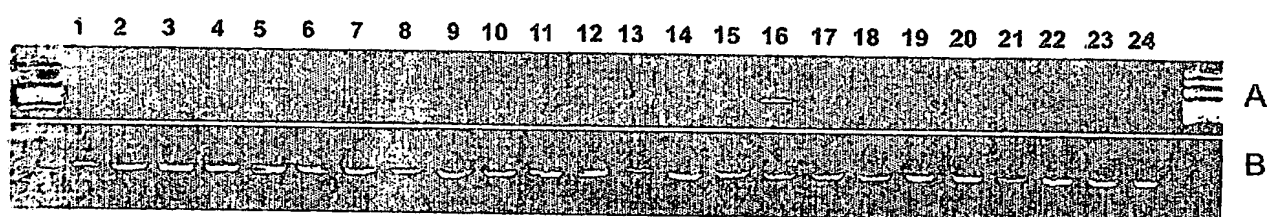


Figure 1

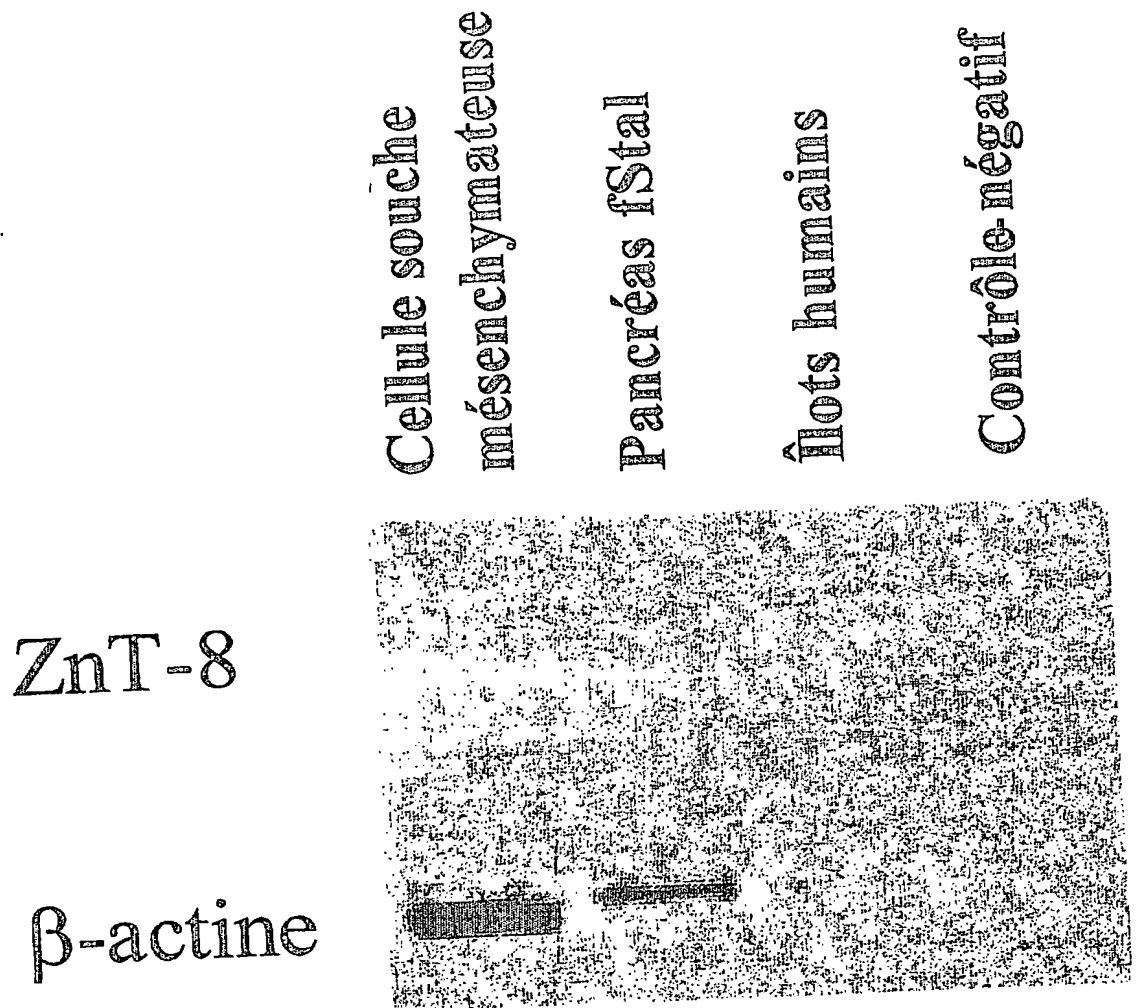


Figure 2



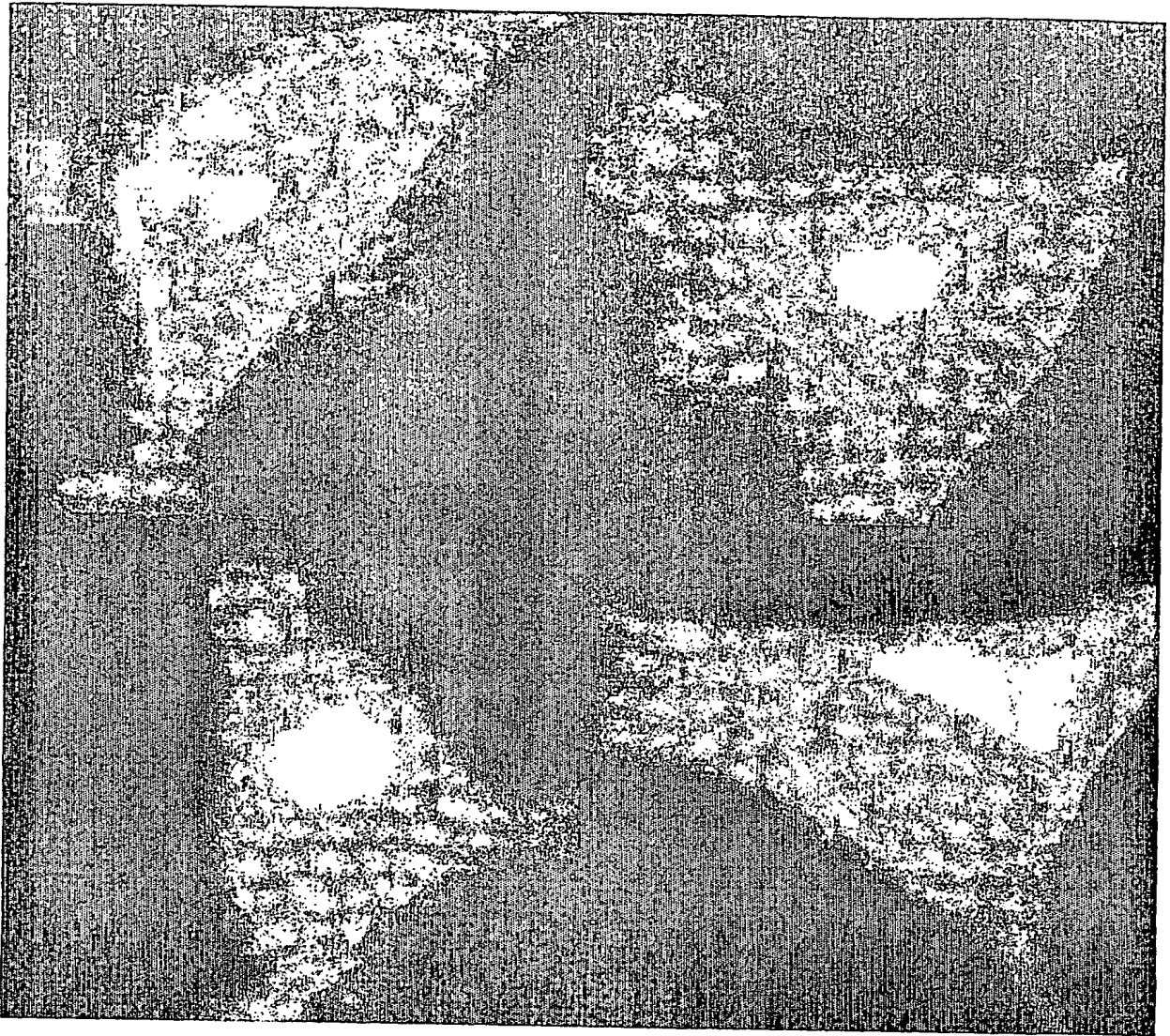


Figure 3

## SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

<120> Polynucléotide spécifique de la cellule pancréatique bêta des îlots  
de Langerhans

<130> CGA263S85

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1110

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1  
atggagtttc ttgaaagaac gtatcttgtg aatgataaag ctgccaagat gcatgctttc 60  
aactagaaa gtgtggaact ccaacagaaa ccggtgaata aagatcagtg tcccagagag 120  
agaccagagg agctggagtc aggaggcatg taccactgcc acagtggctc caagcccaca 180  
gaaaaggggg cgaatgagta cgcctatgcc aagtggaaac tctgttctgc ttcagcaata 240  
tgcttcattt tcatgattgc agaggctgtg ggtgggcaca ttgctgggag tcttgctgtt 300  
gtcacagatg ctgcccacct cttaattgac ctgaccagtt tcctgctcag tctcttctcc 360  
ctgtggctgt catcgaagcc tccctctaag cggtgacat ttggatggca ccgagcagag 420  
atccttggtg ccctgctctc catcctgtgc atctgggtgg tgactggcgt gctagtgtac 480  
ctggcatgtg agcgctgtgt gtatcctgat taccagatcc aggcgactgt gatgatcatc 540  
gtttccagct gcgcagtggc ggccaacatt gtactaactg tggttttgca ccagagatgc 600  
cttggccaca atcacaagga agtacaagcc aatgccagcg tcagagctgc ttttgtgcat 660

gcccttggag atctatttca gagtatcagt gtgctaatta gtgcacttat tatctacttt . 720  
 aagccagagt ataaaatagc cgacccaatc tgcacattca tcttttccat cctgggtcttg 780  
 gccagcacca tcactatctt aaaggacttc tccatcttac tcatggaagg tgtgccaaag 840  
 agcctgaatt acagtgggtgt gaaagagctt attttagcag tcgacgggggt gctgtctgtg 900  
 cacagcctgc acatctggtc tctaacaatg aatcaagtaa ttctctcagc tcatgttgct 960  
 acagcagcca gccgggacag ccaagtgggt cggagagaaa ttgctaaagc ccttagcaaa 1020  
 agctttacga tgcactcact caccattcag atggaatctc cagttgacca ggaccccgac 1080  
 tgccttttct gtgaagaccc ctgtgactag 1110

<210> 2

<211> 369

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Phe Leu Glu Arg Thr Tyr Leu Val Asn Asp Lys Ala Ala Lys  
 1 5 10 15

Met His Ala Phe Thr Leu Glu Ser Val Glu Leu Gln Gln Lys Pro Val  
 20 25 30

Asn Lys Asp Gln Cys Pro Arg Glu Arg Pro Glu Glu Leu Glu Ser Gly  
 35 40 45

Gly Met Tyr His Cys His Ser Gly Ser Lys Pro Thr Glu Lys Gly Ala  
 50 55 60

Asn Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Cys Ser Ala Ser Ala Ile  
 65 70 75 80

Cys Phe Ile Phe Met Ile Ala Glu Val Val Gly Gly His Ile Ala Gly  
 85 90 95

Ser Leu Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu Ile Asp Leu Thr  
 100 105 110

Ser Phe Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Trp Leu Ser Ser Lys Pro Pro  
 115 120 125

Ser Lys Arg Leu Thr Phe Gly Trp His Arg Ala Glu Ile Leu Gly Ala  
 130 135 140

Leu Leu Ser Ile Leu Cys Ile Trp Val Val Thr Gly Val Leu Val Tyr  
 145 150 155 160

Leu Ala Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Thr  
 165 170 175

Val Met Ile Ile Val Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu  
 180 185 190

Thr Val Val Leu His Gln Arg Cys Leu Gly His Asn His Lys Glu Val  
 195 200 205

Gln Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp  
 210 215 220

Leu Phe Gln Ser Ile Ser Val Leu Ile Ser Ala Leu Ile Ile Tyr Phe  
 225 230 235 240

Lys Pro Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys Thr Phe Ile Phe Ser  
 245 250 255

Ile Leu Val Leu Ala Ser Thr Ile Thr Ile Leu Lys Asp Phe Ser Ile  
 260 265 270

Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys  
 275 280 285

Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val His Ser Leu His  
 290 295 300

Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala  
 305 310 315 320

Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys  
 325 330 335

Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu  
 340 345 350

Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys  
 355 360 365

Asp

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 3

gatgctgccc acctcttaat tgac

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 4

tcacatcttttc catcctgggc ttgg

24

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 5

actctagaat ggagtttctt gaaagaacgt a

31

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 6

aatctagagt cacaggggtc ttcacaga

28

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

His	Ile	Ala	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Asp	Ala	Ala	His	Leu	Leu
1				5					10					15	

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Cys	Glu	Arg	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr	Val
1			5					10					15	

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Cys	Leu	Gly	His	Asn	His	Lys	Glu	Val	Gln	Ala	Asn	Ala	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr	Phe	Lys	Pro	Glu	Tyr	Lys	Ile	Ala	Asp	Pro	Ile	Cys
1				5					10			

PCT Application  
PCT/FR2003/003413

